

200829012A

厚生労働科学研究費補助金

平成20年度

新興・再興感染症研究事業

臓器移植や悪性腫瘍による免疫低下状態で発生するウイルス感染症の
予防と治療に関する研究 (H18-新興-一般-013)

総括研究報告書

平成21年3月

研究代表者 森 康子

(神戸大学大学院医学研究科)

目次

I. 総括研究報告

臓器移植や悪性腫瘍による免疫低下状態で発生するウイルス感染症の予防と治療に関する研究

..... 1

研究代表者：森 康子（神戸大学大学院・医学研究科）

II. 分担研究報告

CMV 及び VZV の感染初期過程を阻害する抗ウイルス剤の検索..... 9

研究分担者：井上直樹（国立感染症研究所ウイルス第1部）

臓器移植や悪性腫瘍による免疫低下状態で発生するウイルス感染症の予防と治療に関する研究...16

研究分担者：吉川哲史（藤田保健衛生大学・医学部）

成人 T 細胞白血病発症モデルマウスへの HSV-1 感染と免疫応答..... 19

研究分担者：長谷川秀樹（国立感染症研究所・感染病理部）

臓器移植や悪性腫瘍による免疫低下状態で発生するウイルス感染症の予防と治療に関する研究：ウイルス感染症の発生機序の解明と、効果的な予防策に関する研究「ヒトヘルペスウイルス 6、7 とサイトメガロウイルスの潜伏感染・再活性化による疾患の発症機序の解明と予防」..... 26

研究分担者：近藤一博（東京慈恵会医科大学・ウイルス学講座）

EB ウイルス感染症の発生機序と治療法に関する研究..... 32

研究分担者：藤原成悦（国立成育医療センター研究所・母児感染研究部）

帯状疱疹後神経痛の発症機序の解析とその治療法の開発..... 37

研究分担者：白木公康（富山大学・医学薬学研究部ウイルス学）

RNA 干渉を利用したヘルペスウイルスに対する新規治療法の開発..... 40

研究分担者：水口裕之（医薬基盤研究所・遺伝子導入制御プロジェクト）

人工リンパ組織による免疫不全マウスへの効果的な適応免疫機能導入に関する研究..... 46

研究分担者：末松佐知子（医薬基盤研究所・免疫細胞制御プロジェクト）

水痘帯状疱疹ウイルス特異的細胞性免疫評価による予防接種時期の検討に関する研究..... 48

研究分担者：羽田敦子（（財）田附興風会医学研究所・北野病院第1研究部）

VZV 特異的細胞性免疫能の評価法の確立と疾患における免疫能の比較検討..... 50

研究分担者：森 康子（神戸大学大学院・医学研究科、医薬基盤研究所・感染制御プロジェクトリーダー併任）

HHV-6 の病態解明 -HHV-6 と樹状細胞との相互作用解析-..... 55

研究分担者：森 康子（神戸大学大学院・医学研究科、医薬基盤研究所・感染制御プロジェクトリーダー併任）

III. 研究成果の刊行に関する一覧表..... 58

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

総括研究報告書

臓器移植や悪性腫瘍による免疫低下状態で発生するウイルス感染症の予防と
治療に関する研究

研究代表者：森 康子（神戸大学大学院医学研究科・教授）

研究要旨：近年では臓器移植後患者や悪性腫瘍患者の免疫低下状態において、健常人にはほとんど病原性を示さないヒトサイトメガロウイルス(HCMV)、ヒトヘルペスウイルス6 (HHV-6) が再活性化し、網膜炎、肺炎、脳炎等を引き起こし、致死的な感染症となることが多い。また、免疫不全状態では単純ヘルペスウイルス (HSV)、水痘・帯状疱疹ウイルス (VZV) の再活性化も頻繁に見られ、重篤な感染症を引き起こす。さらに、免疫不全状態のリンパ増殖性疾患 (LPD) などのEBウイルス (EBV) 感染症も問題となっている。本研究においては、免疫低下状態におけるヘルペスウイルス感染症の発症機序および病態解明、免疫低下状態におけるウイルス再活性化の早期診断法、薬剤耐性ウイルスの耐性機序解明とそれらに対する抗ウイルス剤探索、免疫低下状態におけるウイルス感染症の効果的な予防法の開発のための基盤を確立することを目的とする。本年度は、VZV 特異的細胞性免疫能と疾患との関連性、HHV-6 感染機構の解析、造血幹細胞移植後のHHV-6 再活性化機序の解析、前年度に同定された新規抗ウイルス剤候補の機序および効果の解析、HCMV とHHV-6 の再活性化を誘導する疲労の分子メカニズムの検討、ヒト化マウスにおけるEBV 特異的免疫応答についての解析、複数の siRNA 発現カセットを搭載可能な Ad ベクターの開発に関する研究および帯状疱疹後神経痛の発症について解析を行った。本年度は以上の研究によって、臓器移植や悪性腫瘍による免疫低下状態で発生するウイルス感染症の予防と治療に関する研究における各研究項目についてさらに進展させた。

研究分担者

井上直樹 (国立感染症研究所・ウイルス第1部 室長)
吉川哲史 (藤田保健衛生大学医学部 准教授)
長谷川秀樹 (国立感染症研究所・感染病理部 室長)
近藤一博 (東京慈恵会医科大学・微生物学講座第1 教授)
藤原成悦 (国立成育医療センター研究所・母児感染研究部 部長)
白木公康 (富山大学医薬学研究所・ウイルス学 教授)
水口裕之 (医薬基盤研究所・遺伝子導入制御プロジェクト プロジェクトリーダー)
末松佐知子 (医薬基盤研究所・免疫細胞制御プロジェクト プロジェクトリーダー)
羽田敦子 ((財) 田附興風会医学研究所北野病院 第1研究部 主任研究員)

A. 研究目的

近年、骨髄移植、臓器移植が頻繁に行われるようになり、原疾患に対する治療は進歩を遂げているが、移植患者や悪性腫瘍患者に行われる免疫抑制剤投与や化学療法により、以前は日和見とされていたウイルスが活性化し、それらのウイルス感染症によって致死的となる例が増加している。ヒトヘルペスウイルスは、幼少時期に初感染し、潜伏感染するが、免疫抑制状態となった宿主においてウイルスが再活性化し、宿主に様々な病気を引き起こす。近年では臓器移植後患者や悪性腫瘍患者の免疫低下状態において、健康人にはほとんど病原性を示さないヒトサイトメガロウイルス (HCMV)、ヒトヘルペスウイルス6 (HHV-6) が再活性化し、網膜炎、肺炎、脳炎等を引き起こし、致死的な感染症となることが多い。また、免疫不全状態では単純ヘルペスウイルス (HSV)、水痘・帯状疱疹ウイルス (VZV) の再活性化も頻繁に見られ、抗ウイルス剤の投与にもかかわらず、HSV、VZV による遷延性の重篤な感染症を引き起こす。さらに、免疫不全状態のリンパ増殖性疾患 (LPD) などのEBウイルス (EBV) 感染症も問題となっている。本研究では、免疫低下状態で発生する重篤なヘルペスウイルス感染症の病態解明を行い、ウイルス再活性化の早期診断、予防および治療法開発のための基盤を確立することを目的とする。

B. 研究方法

本研究は、研究代表者森、研究分担者9名(井上、吉川、長谷川、近藤、水口、藤原、白木、末松、羽田)の計10名が遂行した。当該年度においては、免疫低下状態におけるウイルス感染症の病態解明、免疫低下状態におけるウイルス再活性化の早期診断法および迅速検査法の確立のための基盤研究、新規抗ウイルス剤候補の検索およびその効果判定、免疫低下状態におけるウイルス感染症の効果的な予防法の開発のための基盤的研究にわけて遂行された。

(倫理面への配慮)

ヒト由来の検体を用いる場合には、疫学研究および臨床研究に関する倫理指針を遵守し、各研究

機関における倫理委員会において承認を得た上で研究を行う。研究対象者に対して個人の不利益・危険性が伴わないように配慮し、また研究の目的、個人の不利益、危険性に対しては十分に説明し、各研究機関の倫理委員会により承認されたインフォームドコンセントにサインあるいは捺印を得た上で研究を行う。

動物実験の倫理面においては、動物愛護と動物福祉の観点から十分な配慮をする。国が定める各種の関連法律および各研究機関が制定する動物実験指針を遵守する。また個々の動物実験については各研究機関の動物実験委員会において審査し、承認を得た上で行う。

C. 研究結果

1. VZV 特異的細胞性免疫能の評価法の確立と疾患における免疫能の比較検討

帯状疱疹の発症には、水痘帯状疱疹ウイルス (VZV) 反応性ヘルパー1型T細胞による細胞性免疫応答の抑制との関連が指摘されている。疫学的に帯状疱疹を発症しやすいとされる疾患の有病者において、この細胞性免疫応答の抑制の可能性を検討するために、健康人および糖尿病患者において、IFN γ -ELISPOT法を用いてVZV特異的細胞性免疫能を測定した。その結果、糖尿病患者においては、健康人と比べてVZV特異的細胞性免疫能が有意に低下していることが明らかとなった。

2. HHV-6の病態解明

ヒトヘルペスウイルス6 (HHV-6) 感染が、樹状細胞の機能、とりわけサイトカイン・ケモカイン等の産生能にどのような影響を及ぼすかを検討した。単球由来樹状細胞 (MoDC) はHHV-6感染に対して、活発にインターロイキン等のサイトカインを産生するような応答はみせない。ところが、MCP-1、MCP-2、IP-10等一部のケモカインはHHV-6

感染によって顕著に上昇した。

3. 造血幹細胞移植後の CMV、EBV、HHV-6 再活性化メカニズム解析

造血幹細胞移植後の HHV-6 再活性化機序を明らかにするとともに、移植後ヘルペスウイルス感染症の中で重要性の高い CMV、EBV 感染との関連性も明らかにするため、経時的に採取した患者末梢血をウイルス学的に解析すると共に、各ウイルス感染状況と種々のバックグラウンドとの関連性について解析した。造血幹細胞移植患者での HHV-6 の再活性化は移植後 2 週間から 4 週間にかけて約半数の患者で認められた。CMV や EBV の再活性化とは異なる感染パターンであり、再活性化にかかわる宿主側因子も異なっている可能性が示唆された。患者背景との関連性を解析した結果、性別には関連はなく、原疾患（悪性腫瘍 vs 非悪性腫瘍）は EBV と HHV-6 感染に関連性があつた。ドナーソースは HHV-6 感染と関連が認められ、HLA マッチングについては EBV 感染との関連性が確認された。

4. HHV-6, 7 と HCMV の潜伏感染・再活性化による疾患の発症機序の解明と予防

本年度は、 β -ヘルペスウイルスに属するヒトサイトメガロウイルス (HCMV) とヒトヘルペスウイルス 6 (HHV-6) の再活性化を誘導する疲労の分子メカニズムを検討し、疲労現象の中核をなす分子である疲労因子を同定した。この分子は、これらのウイルスの再活性化や、HHV-6 の中枢神経病原性遺伝子の発現を誘導する機能を有していた。また、昨年までに報告した、HHV-6 再活性化を抑制する機能を有する補完医療薬成分が、この疲労因子を抑制することによって HHV-6 再活性化を予防していることも見出し、 β -ヘルペスウイルス再活性化抑制法の開発のための分子機構に関する知見や、再活性化抑制物質のスクリーニング法を得ることができた。

5. CMV 及び VZV の感染初期過程を阻害する抗ウイルス剤の検索

昨年度までに 9600 種類のランダム化合物からサイトメガロウイルス (CMV) 及び水痘帯状疱疹ウイルス (VZV) に効果のある化合物を、各ウイルス用レポーター細胞株を用いて検索し、50% 阻害濃度 (EC50) $20 \mu\text{M}$ 以下で感染初期過程に阻害効果があり、かつ細胞毒性が見られない化合物として、VZV 及び CMV に対しそれぞれ数種類を選定した。抗 CMV 化合物のうち、146F7 と 133G4 と名づけた化合物の作用機序の解析を行い、146F7 は感染後ウイルス遺伝子発現までの過程を、133G4 は前初期蛋白による遺伝子活性化を阻害することを明らかにした。本年度は、133G4 の阻害機構をさらに詳細に検討し、TBP のリクルートメント以降の過程、おそらく Mediator 機能の阻害ではないかという結果を得た。また、VZV に対する化合物の阻害効果について、DNA 複製や初期遺伝子発現の阻害を検討し、その作用点を大まかに区分した。

6. EB ウイルス感染症の発症機序と治療法に関する研究

EB ウイルス (EBV) 関連リンパ増殖性疾患について、ヒト化マウスを用いた疾患モデルの作製を通じて、発症機序解明と治療法開発を進めている。本年度は、このモデルにおける EBV 特異的免疫応答について解析した。EBV 抗原ペプチドを提示する MHC クラス I テトラマーによる解析では、EBV 感染マウス末梢血 CD8 陽性細胞のうち 0.1~0.7% が EBV 特異的 T 細胞であった。また、ヒトの EBV 初感染時に血中レベルが上昇する IFN- γ が感染マウスの血中でも増加していた。EBV 感染細胞と感染マウス由来 CD8 陽性細胞を混合培養する実験では、CD8 陽性細胞が感染細胞の増殖を抑制することが示唆された。これらの結果は、このモデルにおいてウイルス特異的 T 細胞免疫応答が誘導され、実際に EBV 感染に対する防御機構として働くことを示唆している。EBV

感染マウスに免疫不全を人為的に誘導し、LPD 発症の条件を詳細に解析することが可能であると考えられる。

7. 帯状疱疹後神経痛の発症機序の解析とその治療法の開発

移植患者では、免疫不全状況のため帯状疱疹を発症しやすく、その合併症として、帯状疱疹後神経痛が知られている。帯状疱疹後神経痛の発症機序は明らかではない。帯状疱疹の経過中に痛覚過敏を生じるが、その痛覚過敏は同様な病変を生じる単純ヘルペスウイルスとは対照的で、帯状疱疹特有とされる。このように帯状疱疹に特徴的な帯状疱疹関連神経痛や帯状疱疹後神経痛の発症について検討した。帯状疱疹患者では、帯状疱疹経過中から水痘ウイルスに対する強い抗体産生が行われることから、水痘ウイルスに対する免疫応答が痛覚過敏を生ずる可能性を検討した。この研究では、前初期抗原 IE62 に対する免疫応答に注目した。IE62 に対するモノクローナル抗体が、痛覚にかかわる脳由来栄養因子 (BDNF) と免疫交差し、その生理活性を増強し、末梢神経損傷マウスで、痛覚過敏を生じることが確認された。

8. RNAiを利用した新規治療法の開発

アデノウイルス (Ad) ベクターに short interfering RNA (siRNA) 発現カセットを導入する事で、ヘルペスウイルスの replication に関わる遺伝子をターゲットとすることで効果的な増殖抑制を期待する。昨年度においては、VZV orf68 に対する siRNA 発現 Ad ベクターを用いることによって VZV の増殖が抑制可能であることを示した。しかしながら、その増殖抑制の程度は低かったことから、さらに強力な siRNA 発現 Ad ベクターが必要と考え、本年度は複数の siRNA 発現カセットを搭載可能な Ad ベクターの開発を行った。

9. 成人 T 細胞白血病発症モデルマウスへの HSV-1 感染と免疫応答

成人 T 細胞白血病発症モデルマウスを使用することで、白血病発症に伴う免疫低下時に HSV-1 の

再活性化をモニターし、免疫応答の変化を解析することを目的とした。その結果、HSV-1 潜伏感染状態で白血病を発症することでマウスの生存率は著しく低下し、HSV-1 に対する血清 IgG 応答が低下していることが明らかになった。

10. 人工リンパ組織による免疫不全マウスへの効果的な適応免疫機能導入に関する研究

既知の抗原を発現させた細胞株に反応するリンパ球を組み込んだ人工リンパ組織を構築して重症複合性免疫不全 (SCID) マウスに導入しておき、当該細胞株を皮内移植すると移植した細胞に対して増殖抑制が起こり、効果的に排除されることが分かった。この細胞株に対する増殖抑制効果は、細胞株で免疫したマウスから調整したリンパ球を静脈経路で導入した場合に比べて、有意に優れていた。また、人工リンパ組織を導入して細胞株を皮内移植した SCID マウスの脾臓細胞中にはインターフェロン γ (IFN- γ) 産生細胞が多数存在し、さらに当該細胞株に対する細胞傷害活性を示すことが明らかになった。これらの結果から人工リンパ組織は免疫不全状態でのウイルス感染症の予防や治療法の開発に役立つ事が示唆された。

D. 考察

臓器移植後患者や悪性腫瘍患者の免疫低下状態において、健康人にはほとんど病原性を示さない HCMV、HHV-6 が再活性化し、致死的な感染症となることが多い。免疫不全状態では HSV、VZV の再活性化も頻繁に見られ、遷延性の重篤な感染症を引き起こし、リンパ増殖性疾患 (LPD) などの EBV 感染症も問題となっている。本研究においては、免疫低下状態におけるヘルペスウイルス感染症の発症機序および病態解明、免疫低下

状態におけるウイルス再活性化の早期診断法、薬剤耐性ウイルスの耐性機序解明とそれらに対する抗ウイルス剤検索、免疫低下状態におけるウイルス感染症の効果的な予防法の開発のための基盤を確立することを目的とする。

本年度は以下の成果を得ることができた。(1) 糖尿病患者において健常者に比較し、VZV 特異的細胞性免疫能の低下が有意に認められた。(2) 基礎疾患別帯状疱疹発症頻度を判定し、基礎疾患別帯状疱疹発症リスクを評価した。(3) 造血幹細胞移植患者での HHV-6 の再活性化は移植後 2 週間から 4 週間にかけて約半数の患者で認められた。CMV や EBV の再活性化とは異なる感染パターンであり、再活性化にかかわる宿主側因子も異なっている可能性が示唆された。(4) 146F7 (別名 DPPC) は、ヒト CMV の遺伝子発現前過程の阻害という新規機序を有し、動物 CMV にも効果を示した。(5) ヒト化マウスモデルにおいて EB ウイルス特異的 T 細胞免疫応答が誘導され、実際に EBV 感染に対する防御機構として働くことを示した。(6) VZV IE62 に対するモノクローナル抗体が、痛覚にかかわる脳由来栄養因子 (BDNF) と免疫交差し、その生理活性を増強し、末梢神経損傷マウスで、痛覚過敏を生じることが確認された。(7) 複数の siRNA 発現カセットを搭載可能な Ad ベクターの開発を行った。

F. 健康危機管理情報

特に問題なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fukui Y, Shindoh K, Yamamoto Y, Koyano S, Kosugi I, Yamaguchi T, Kurane I, Inoue N. Establishment of a cell-based assay for screening of compounds inhibiting very early events in cytomegalovirus replication cycle and characterization of a compound identified using the assay. *Antimicrob Agents Chemother.* 52: 2420-7, 2008.
- 2) Nozawa N, Yamamoto Y, Fukui Y, Katano H,

Tsutsui Y, Sato Y, Yamada S, Inami Y, Nakamura K, Yokoi M, Kurane I, Inoue N. Identification of a 1.6 kb genome locus of guinea pig cytomegalovirus required for efficient viral growth in animals but not in cell culture. *Virology.* 379:45-54, 2008.

- 3) Ohashi, M, Sugata K, Ihira M, Asano Y, Egawa H, Takada Y, Uemoto S, Yoshikawa T. Human herpesvirus 6 infection in adult living related liver transplant recipients. *Liver Transplant.* 14:100-9, 2008.
- 4) Fujita A, Ihira M, Suzuki R, Enomoto Y, Sugiyama H, Suga S, Asano Y, Yagasaki H, Kojima S, Matsumoto K, Kato K, Yoshikawa T. Elevated serum cytokine levels are associated with human herpesvirus 6 reactivation in hematopoietic stem cell transplantation recipients. *J Infect.* 57:241-8, 2008.
- 5) Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Fukushi S, Harashima A, Sato Y, Saijo M, Taguchi F, Morikawa S, Sata T. Mouse-passaged severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus leads to lethal pulmonary edema and diffuse alveolar damage in adult but not young mice. *Am J Pathol.* 172:1625-37, 2008.
- 6) Kamijuku H, Nagata Y, Jiang X, Ichinohe T, Tashiro T, Mori K, Taniguchi M, Hase K, Ohno H, Shimaoka T, Yonchara S, Odagiri T, Tashiro M, Sata T, Hasegawa H, Seino KI. Mechanism of NKT cell activation by intranasal coadministration of α -galactosylceramide, which can induce cross-protection against influenza viruses. *Mucosal Immunol.* 1:208-18, 2008.
- 7) Ichinohe T, Iwasaki A, Hasegawa H. Innate sensors of influenza virus: clues to developing better intranasal vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 7:1435-45, 2008.
- 8) Hasegawa H, Ichinohe T, Aina A, Tamura

- S, Kurata T. Development of an inactivated mucosal vaccine for H5N1 influenza virus. Therapeutic and Clinical Risk Management. in press.
- 9) Takahashi Y, Hasegawa H, Hara Y, Ato M, Ninomiya A, Takagi H, Odagiri T, Sata T, Tashiro M, Kobayashi K. Protective immunity afforded by H5N1 (NIBRG-14)-inactivated vaccine requires both antibodies against hemagglutinin and neuraminidase in mice. *J Infect Dis.* in press.
- 10) Yajima M, Imadome K, Nakagawa A, Watanabe S, Terashima, K, Nakamura, H, Ito M, Shimizu N, Honda M, Yamamoto N, Fujiwara S. A new humanized mouse model of EBV infection reproducing persistent infection, lymphoproliferative disorder, and cell-mediated and humoral immune responses. *J Infect Dis.* 198:673-82, 2008.
- 11) Nakamura H, Ishii C, Suchiro M, Iguchi A, Kuroda K, Shimizu K, Shimizu N, Imadome K, Yajima M, Fujiwara S. The latent membrane protein 1 (LMP1) encoded by Epstein-Barr virus induces expression of the putative oncogene Bcl-3 through activation of the nuclear factor- κ B. *Virus Res.* 131:170-9, 2008.
- 12) Imadome K, Shimizu N, Yajima M, Watanabe K, Nakamura H, Takeuchi H, Fujiwara S. CD40 signaling activated by Epstein-Barr virus promotes cell survival and proliferation in gastric carcinoma-derived human epithelial cells. *Microbes Infect.* in press.
- 13) Oshima K, Kanda Y, Kako S, Asano-Mori Y, Watanabe T, Motokura T, Chiba S, Shiraki K, Kurokawa M. Case report: persistent cytomegalovirus (CMV) infection after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation using in vivo alemtuzumab: emergence of resistant CMV due to mutations in the UL97 and UL54 genes. *J Med Virol.* 80:1769-75, 2008.
- 14) Akahori Y, Suzuki K, Daikoku T, Iwai M, Yoshida Y, Asano Y, Kurosawa Y, Shiraki K. Characterization of neutralizing epitopes of varicella-zoster virus glycoprotein H. *J Virol* 83. 2020-4, 2009.
- 15) 末松 佐知子. 人工リンパ組織構築とは何か. *Organ Biology* 15: 23-32, 2008.
- 16) Sadaoka K, Okamoto S, Gomi Y, Tanimoto T, Yoshikawa T, Asano Y, Yamanishi K, Mori Y. Measurement of varicella-zoster virus (VZV)-specific cell-mediated immunity - Comparison of VZV-skin test and interferon-gamma ELISPOT assay. *J Infect Dis.* 198:1327-33, 2008.
- 17) 岡本成史、森 康子. 帯状疱疹ワクチン開発に向けた取り組み. *臨床と微生物* 36:69-73, 2009.
- 18) Takemoto M, Imasawa T, Yamanishi K, and Mori Y. Role of dendritic cells infected with human herpesvirus 6 in virus transmission to CD4⁺ T cells. *Virology*, in press.

2. 学会発表

- 1) 福井良子、神道慶子、小杉伊三夫、山口十四文、倉根一郎、井上直樹. レポーター細胞株を用いた cell-based high-throughput screening により同定された新規抗サイトメガロウイルス (CMV) 化合物の作用機序の解析. 第18回抗ウイルス療法研究会. 2008年5月 鹿児島.
- 2) 井上直樹、倉根一郎. 水痘帯状疱疹ウイルス (VZV) およびサイトメガロウイルス (CMV) の前初期蛋白による転写活性化機能を阻害する新型抗ウイルス化合物の解析. 第56回日本ウイルス学会学術集会. 2008年10月 岡山.
- 3) 山田壮一、野沢直樹、片野晴隆、倉根一郎、井上直樹. 個体での増殖にのみ必要なモルモットサイトメガロウイルス (CMV) 1.6kb ゲノム領域の遺伝子群

- は、ヒト CMV の弱毒化に関与する遺伝子群に相同性を有する。第 56 回日本ウイルス学会学術集会。2008 年 10 月 岡山。
- 4) 長谷川秀樹、辻隆裕、澤洋文、佐多徹太郎。成人 T 細胞性白血病マウスモデルにおける細胞走化因子の解析。第 97 回日本病理学会総会。2008 年 5 月 金沢。
 - 5) 長谷川秀樹、一戸猛志、相内章、田村慎一、小田切孝人、田代真人、倉田毅、佐多徹太郎。キノコ類菌糸体抽出物を用いた経鼻粘膜ワクチンによる粘膜免疫増強作用とインフルエンザウイルスの感染防御。第 56 回日本ウイルス学会学術集会。2008 年 10 月 岡山。
 - 6) 相内章、一戸猛志、田村慎一、倉田毅、佐多徹太郎、長谷川秀樹。経鼻ワクチンにおける Dectin-1 リガンドによるアジュバント効果の亢進。第 56 回日本ウイルス学会学術集会。2008 年 10 月 岡山。
 - 7) 永田典代、岩田奈緒子、長谷川秀樹、福士秀悦、西條政幸、森川茂、佐藤由子、佐多徹太郎。SARS-CoV 感染動物モデルを用いた SARS 発症機序の解明と治療法の検討。第 56 回日本ウイルス学会学術集会。2008 年 10 月 岡山。
 - 8) Kondo K, Kobayashi N, Shimada K, Kuratsune H, Matsunaga H. Identification of novel HHV-6 latent protein associated with mood disorders in CFS, depressive disorder, bipolar disorder and HHV-6 encephalopathy. International Symposium on Viruses in Chronic Fatigue Syndrome, June 2008, Baltimore MD, USA.
 - 9) 小林伸行、嶋田和也、清水昭宏、近藤一博。ヒトヘルペスウイルス(HHV)-6 潜伏感染中間状態特異的タンパクによる気分障害の発症機序。第 56 回日本ウイルス学会学術集会。2008 年 10 月 岡山。
 - 10) 鎌田美乃里、近藤一博。HHV-6 感染 SCID-hu マウスを用いた HHV-6 潜伏感染細胞の同定。第 56 回日本ウイルス学会学術集会。2008 年 10 月 岡山。
 - 11) 清水昭宏、小林伸行、近藤一博。遺伝子治療を目的としたヒトヘルペスウイルス 6 ペクターの性状解析。第 56 回日本ウイルス学会学術集会。2008 年 10 月 岡山。
 - 12) 嶋田和也、近藤一博。スプライシング関連因子 SART3 のアンチセンスによるヒトヘルペスウイルス 6(HHV-6) ic1/ic2 mRNA の選択的スプライシングに対する影響。第 56 回日本ウイルス学会学術集会。2008 年 10 月 岡山。
 - 13) 新井文子、廣田理子、長尾俊景、三浦修、服部高明、渡辺睦房、富満弘之、横田隆徳、水澤英洋、今留謙一、藤原成悦。化学療法後に運動神経優位の末梢神経障害を認めた慢性活動性 EB ウイルス感染症。第 18 回 EB ウイルス感染症研究会。2008 年 3 月 東京。
 - 14) 新井文子、廣田理子、長尾俊景、三浦修、今留謙一、藤原成悦。Capizzi 療法 AraC 投与時に高度の発熱、心不全を合併した慢性活動性 EB ウイルス感染症成人例 3 例の臨床経過の検討。第 18 回 EB ウイルス感染症研究会。2008 年 3 月 東京。
 - 15) 矢島美彩子、今留謙一、中川温子、渡辺哲、寺嶋一夫、中村浩幸、逸見千寿香、伊藤守、清水則夫、山本直樹、藤原成悦。ヒト化 NOG マウスモデルにおける EB ウイルス持続感染。EB ウイルス研究会。2008 年 7 月 米子。
 - 16) 矢島美彩子、今留謙一、渡辺哲、寺嶋一夫、中村浩幸、逸見千寿香、清水則夫、山本直樹、藤原成悦。ヒト化 NOG マウスモデルにおける EB ウイルス持続感染。第 56 回日本ウイルス学会学術集会。2008 年 10 月、岡山。
 - 17) 櫻井 文教、中島 加珠子、吉井 洋紀、松浦 正明、川端 健二、森 康子、水口 裕之。siRNA 発現 Ad ベクターを用いた水痘・帯状疱疹ウイルスの増殖抑制。遺伝子・デリバリー研究会第 8 回シンポジウム。2008 年 5 月 豊中。
 - 18) Suematsu S, Hattori Y. Characteristic vascular system induction is important for

artificial lymphoid tissue construction and its immune function. 第 38 回日本免疫学会総会学術集会. 2008 年 12 月 京都.

- 19) 服部 祐紀, 末松 佐知子. 腫瘍特異的人工リンパ組織による抗腫瘍効果. 第 8 回再生医療学会総会. 2009 年 3 月 東京.
- 20) Hata A, Matsuda M, Ohkusa Y. History of certain diseases poses higher risk for herpes zoster: a hospital-based study. 33rd International Herpesvirus Workshop, July 2008, Estoril, Portugal.
- 21) 定岡 恵, 岡本成史, 五味康行, 谷本武史, 石川豊数, 吉川哲史, 浅野喜造, 高橋理明, 山西弘一, 森 康子. 水痘帯状疱疹ウイルス特異的な細胞性免疫能測定における皮内試験と IFN-gamma ELISPOT 法との比較検討. 第 23 回ヘルペスウイルス研究会. 2008 年 6 月 鳥取県西伯郡伯耆町.
- 22) Sadaoka K, Okamoto S, Gomi Y, Tanimoto T, Ishikawa T, Yoshikawa T, Asano Y, Yamanishi K, Mori Y. Comparison of skin test and interferon-gamma ELISPOT assay on measurement of varicella-zoster virus (VZV)-specific cell-mediated immunity. 33rd International Herpesvirus Workshop, July 2008, Estoril, Portugal.
- 23) Takemoto M, Imazawa T, Yamanishi K, Mori Y. Human herpesvirus-6 effectively transmits from dendritic cells to CD4⁺ T cells. 6th International Conference on HHV-6 & 7. June 2008, Baltimore MD, USA.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- 1) 近藤一博. HHV-6 再活性化を用いた疲労度評価方法およびその利用. 特許番号: 特許第 4218842 号. 2008 年 11 月 21 日.

2. 特許出願

- 1) 近藤一博, 小林伸行. HHV-6 潜伏感染に関連する気分障害を治療又は予防する方法. 米

国出願番号 No.61/102,441. 出願日 2008 年 10 月 3 日.

- 2) 近藤一博, 清水昭宏, 高倉由光, 市川雅子. HHV-6 再活性化検出のためのウイルス濃縮法. 特願 2008-092816. 出願日 2008 年 3 月 31 日.
- 3) 近藤一博, 清水昭宏, 高倉由光, 市川雅子. HHV-6 再活性化測定のためのウイルス定量法. 特願 2008-093288. 出願日 2008 年 3 月 31 日.

CMV 及び VZV の感染初期過程を阻害する抗ウイルス剤の検索

研究分担者 井上 直樹 国立感染症研究所ウイルス第1部

研究要旨 昨年度までに 9600 種類のランダム化合物からサイトメガロウイルス (CMV) 及び水痘帯状疱疹ウイルス (VZV) に効果のある化合物を、各ウイルス用レポーター細胞株を用いて検索し、50% 阻害濃度 (EC50) 20 μ M 以下で感染初期過程に阻害効果があり、かつ細胞毒性が見られない化合物として、VZV 及び CMV に対しそれぞれ数種類を選定した。抗 CMV 化合物のうち、146F7 と 133G4 と名づけた化合物の作用機序の解析を行い、146F7 は感染後ウイルス遺伝子発現までの過程を、133G4 は前初期蛋白による遺伝子活性化を阻害することを明らかにした。本年度は、133G4 の阻害機構をさらに詳細に検討し、TBP のリクルートメント以降の過程、おそらく Mediator 機能の阻害ではないかという結果を得た。また、VZV に対する化合物の阻害効果について、DNA 複製や初期遺伝子発現の阻害を検討し、その作用点を大まかに区分した。さらに、モルモットでの CMV 増殖に対する化合物の阻害効果を検討する方法を確立する過程において、ATCC より購入したモルモット CMV には、2 種類のウイルスが存在し、その差はゲノム 240kb 中の 1.6kb の有無であることを明らかにした。そして、この 1.6kb 領域が細胞培養での増殖には不要であるが、動物個体での増殖に必須であることを見出した。

A. 研究目的

現在用いられている抗ヘルペスウイルス薬は、CMV の前初期蛋白 IE2 に対するアンチセンス RNA であるフォミビルセンを除き、DNA 複製を阻害する核酸基質アナログである。これらの核酸基質アナログの抗ウイルス薬は有効であるが、耐性株の出現、副作用、投与方法などのため使用上の制約があり、作用機序の異なる新規薬剤の開発が求められている。特に、臓器移植においては CMV 感染症を防ぐために核酸基質アナログであるガンシクロビル (GCV) が用いられているが、骨髄機能抑制の副作用により好中球減少が生じ、結果として細菌・真菌などの日和見感染症を増悪化させるため、生存率など移植全体としてみた場合には、決して満足できる結果をもたらさない。

我々は、ウイルス前初期 (IE) 蛋白により活性化される初期遺伝子プロモーターを利用し、酵素反応による化学発光を指標として容易に力価を測定できるレポーター細胞株を CMV 及び VZV について樹立し、2 日で高感度に感染力価を求めることができることを示した。これらのレポーター細胞株を用いて、CMV 及び VZV の感染初期過程を阻害する抗ウイルス薬の検索を過去 2 年間に行った。本年度は、得られた化合

物についてその作用機序を検討すること、さらに、抗ウイルス化合物を動物レベルで評価する方法を確立することを目標として研究を行った。

B. 研究方法

1) ウイルス株及び細胞株

MeWo 細胞及びヒト 2 倍体細胞 HLF は、10% 牛胎児血清 (FBS) 添加 Dulbecco's MEM (DMEM) 培地にて培養した。VZV Oka 親株を MeWo ないしは HLF 細胞で培養した。テロメラーゼ遺伝子により不死化されたヒト繊維芽細胞 hTERT-BJ1 は、10% FBS 添加 DMEM:199(4:1) 培地にて培養した。CMV Towne 株は、hTERT-BJ1 細胞にて培養した。VZV レポーター細胞 MV9G 及び CMV レポーター細胞 U4C は、100 μ g/ml G418 及び 10% FBS 添加 DMEM にて培養した。モルモット CMV (GPCMV) は、10% FBS 添加 F12 培地を用いてモルモット繊維芽細胞 GPL で、マウス CMV (MCMV) は、10% FBS 添加 DMEM を用いて NIH3T3 細胞で増殖させた。

2) 化合物

ランダム化合物 (Maybridge) は DMSO に終濃度 10-100mM となるように溶解し、使用直前に培地で希釈して用いた。構造活性相関のための

化合物の合成は、山口十四文先生(帝京科学大学)の協力を得て行われた。

3) レポーターアッセイによる薬剤効果の評価

感染初期過程に対する薬剤効果の検討には直接感染法を、DNA複製や粒子形成などIE蛋白によるレポータープロモーター活性化以降の後期過程を含めた感染過程全体に対する薬剤効果の評価には共培養法を用いた。

a) 直接感染法: 96穴プレートにまき込んだ未感染細胞(VZVではMeWo, CMVではhTERT-BJ1)に、1穴当たり500-1000PFUの細胞フリーウイルス及び薬剤を加え、2~3日培養し、培地を除いた後、長時間タイプの発光基質を加え20分~1時間反応後、ルミノメーターを用いてルシフェラーゼの相対的活性を測定した。

b) 共培養法: 96穴プレートに $2.5 \sim 4 \times 10^4$ 細胞/穴でまきこんだ未感染細胞に、VZVの場合1穴あたり1000-3000個のVZV感染細胞及び薬剤を、CMVの場合1穴あたり4000PFUの細胞フリーウイルスと薬剤を加え2日間培養した。 $2.5 \sim 4 \times 10^4$ のレポーター細胞を重層し、さらに1日培養後、ルミノアッセイを行った。

4) 免疫染色及び蛍光抗体法

感染細胞をPBSにて洗浄後3.7%ホルマリンにて5分間処理し、PBSにて3回洗浄後0.5% TritonXを含むPBSで10分間処理した。PBSにて3回洗浄後、希釈した抗VZV IE62モノクローナル抗体ないしは抗CMV IE2モノクローナル抗体を1時間反応させ、PBS洗浄後、さらにペルオキシダーゼ標識抗マウス抗体と反応後DAB基質による発色反応、ないしは、FITC標識抗マウス抗体と反応後蛍光反応の観察を行った。

5) プラーク形成阻害アッセイ

12穴プレートにまき込んだ細胞に50-100PFU/穴でウイルスを接種し1-2時間培養後、接種液を除き、2倍階段希釈した薬剤、1%メチルセルロース、4%FBSを含むMEM培地で培養した。2% crystal violetを含む10%ホルマリンで固定染色後プラーク数を実体顕微鏡下で測定し、薬剤濃度に対するプラーク形成阻害率をLinear regression法にて解析しEC50を求めた。

6) リアルタイムPCR及びRT-PCR

感染細胞からのDNA及びRNAサンプルの精製には、市販キット(キアゲン)を用いた。

リアルタイムPCRには、市販キット(Applied Biosciences, TaqMan Universal PCR Master

Mix)を用いた。用いたプライマー及びTaqManプローブは、表1にまとめた。スタンダードには、HCMV UL83及びVZV IE62遺伝子をクローニングしたプラスミドDNA、ヒトB細胞株から抽出したDNAをそれぞれ用いた。

リアルタイムRT-PCRも、市販キット(Applied Biosciences, One-step RT-PCR Master Mix)を用いた。用いたプライマー及びTaqManプローブは、表1にまとめた。

7) ChIPアッセイ

133G4などの阻害化合物存在下でCMVをU4Cレポーター細胞に感染させ、定法に従い、formalinでDNA-蛋白のクロスリンクを行いglycineで中和後、核画分を調製した。予備実験で決定した超音波処理条件で平均長が0.5-1kbのクロマチン断片を調製した。ポリメラーゼII(Pol II)に対する抗体、TBPに対する抗体、コントロールの無関係な抗体を加え、市販のキットを用いて免疫沈降されたDNA断片を得た。このDNA断片中の標的DNA量をリアルタイムPCRで測定し、免疫沈降前の量と比較した。

8) モルモット感染実験

ATCCより購入し数代GPL細胞で継代したGPCMVストック(ATCC-P5)から独立なウイルスクローンを得た(CA-P2からCJ-P2)。 1×10^6 PFUのGPCMVを腹腔内に接種し、6-7日ないしは20-21日後に、各臓器を採取し、リアルタイムPCR法で、GPCMVのDNA量を測定した。その際、1.6kb欠損の有無を同定できるプライマー・プローブを用いた。

(倫理面への配慮)

動物実験は、実験動物委員会の承認を得て、動物愛護の精神のもとに適切に行った。組換えDNA実験は、大臣確認申請に対する承認を得ることを含め、法に基づき適切に行った。

C. 研究結果

1. 146F7に加え、抗CMV活性を有する167F6がウイルス感染後前初期遺伝子発現以前の過程を阻害することを示した。167F6は、HSV1に対し弱い抗ウイルス活性を示し、高MOI感染後期で細胞融合の頻度を高めることが観察された。
2. 133G4に加えて179H7、15E8が、CMV及びVZVを阻害することから、正確な阻害効果及び細胞毒性濃度を求めた。CMVに対する結果は、133G4はGCVより若干効果濃度は高いものの十分な阻害を示し毒性も問題とならないもので

あった。また、ニトロ基が阻害活性に重要であることがわかった。(表2)

3. 133G4、179H7、15E8の3化合物は、CMV IE2及びVZV IE62による遺伝子活性化機能を阻害した。そこで、分子レベルでの詳細な阻害機序の検討し以下の結果を得た。
 - a) 一過性の遺伝子導入系においてIE2により活性化される様々なプロモーターからの遺伝子発現を133G4は阻害した(図1)。
 - b) プロモーターによるが、IE62の遺伝子活性化にDNAとの直接的結合の関与が報告されているので、IE62特異的DNA結合がこれら化合物の阻害に必要なかを検討した。GAL4配列結合ドメイン(GAL4DB)とIE62のN端の遺伝子活性化ドメインの融合蛋白(GAL4-IE62N)を発現するプラスミドともに薬剤存在下で遺伝子導入したところ、依然として阻害効果があったことから、IE62特異的DNA結合が作用標的ではないことが示された(図2A)。
 - c) USF1結合配列とTATA配列のみがレポーター細胞樹立に用いたプロモーター中に存在する。USF1やTATA結合蛋白(TBP)は、CMV IE2及びVZV IE62が直接相互作用する細胞蛋白として知られる。そこで、GAL4-USF1、GAL4-TBPの両融合蛋白を作成し、IE2、IE62との相互作用の阻害の可能性を検討したが、依然として阻害効果が認められた(TBPの例、図2B)。従って、USF1蛋白やTBP蛋白のDNAとの結合を阻害しているわけではないことがわかった。
 - d) ChIPアッセイを行いPolIIのプロモーターへの結合量を測定したところ、これら化合物によりPolIIの減少が見られたことから、TBPのTATA配列へのrecruitment以降の過程を阻害すると考えられる。(図3)
4. レポーター細胞で同定した抗VZV化合物について、複製ウイルスDNA量をリアルタイムPCRで測定し、9化合物が20 μ M濃度で20%以下と明確な効果を示した(図4A)。これらのうち少なくとも5種類の化合物により、顕著に初期遺伝子ORF21の発現が阻害され、さらに、そのうちの4種類は、前初期遺伝子ORF62の発現も阻害した(図4B)。従って、45B5、26F11、31G3、170G4の4化合物は、感染から前初期遺伝子発現までの過程を阻害するものであり、47B5は、初期遺伝子発現からDNA複製の間の過程を阻害するものである。抗IE62抗体を用いた蛍光抗体法の結果、141B3はIE62蛋白の発現がみられるものの、そのパターンは、diffuseで蛍光強度も弱かった(図4C)。従って141B3はIE62

蛋白の翻訳後修飾などを阻害している可能性がある。

5. CMVの場合、動物匹数を制限して抗ウイルス効果を定量的にかつ簡便に測定する方法は確立されていない。GPCMVの皮下接種と各臓器での増殖をウイルス抗原の頻度を比較したところ、皮膚でより多くの抗原を検出できた。(図5)
6. そこで、緑色蛍光蛋白を発現するGPCMVを作成し、皮膚でのGPCMVの増殖を簡便に観察できるようにすることで、抗CMV化合物の動物個体での簡便な評価を行えるようにしようと考えた。組換えGPCMVは培養細胞内では親株と同程度に増殖することを示した。しかしながら、モルモット個体に接種したところ、増殖がほとんど起こらないことがわかり、その原因を検討したところ、ATCCより購入したGPCMVのストックには2種類、すなわち、図6Aに示す1.6kb領域が欠けたウイルス(GPCMV/del)と正常なウイルス(GPCMV/full)、が混じっていることが明らかとなった。ATCCからのストックから独立なクローンを分離したところ、約半分が1.6kb領域が欠けたGPCMV/del、残りが正常なGPCMV/fullであった。また、培養細胞では両株間の増殖性に差は見られなかった(図6B)。両者が3:2(60%:40%)の比で混じったATCC由来のGPCMVストックを、動物に接種し、各臓器における両者の比を比べたところ、唾液腺の200倍を筆頭にGPCMV/fullがGPCMV/delに比べ増殖性が高いことが示された。(図6C)。独立のクローンをを用いた場合にも同様の結果を得た。以上の結果より、1.6kb領域が動物個体での増殖には必須であり、今後、簡便に化合物の評価を動物で行うための組換えGPCMVの作成には、この領域が存在することが必要要件であることが明確になった。

D. 考察

ランダムに検索して得られた133G4、179H7、15E8の3化合物に類似性があった。構造活性相関解析から、3化合物に共通するニトロ基が阻害活性に重要であるとの知見を得た。さらに、いくつかの誘導體では著しい細胞毒性が生じることから、これら3化合物の標的が細胞側の因子である可能性が示唆される。作用機序の検討から、IE2やIE62といった前初期蛋白のプロモーターでの転写活性化が阻害されており、転写に関わる細胞因子を標的としていると推測される。Mediatorと呼ばれる一連の蛋白群は、転写活性化因子と共同して作用し、TBPを含むプレ

コンプレックスへのポリメラーゼ結合を促進する。ChIP アッセイなどから得られた知見から、133G4 は Mediator の機能を阻害するのではないかと考えられる。アデノウイルスの転写活性化因子 E1A は、Mediator のひとつ Med23 と、ヒトヘルペスウイルス8の Rta は Med12 と結合することが知られている。また、最近 VZV IE62 が Med25 と相互作用することが報告されている。従って、個々の Med 蛋白とウイルス特異性との関連、ウイルスによる転写活性化機構における Med 蛋白の役割、そして細胞因子として抗ウイルス薬の主要な標的となり得る可能性などについて、今後さらに解析が必要と思われる。

動物個体での抗ウイルス化合物の評価は必須であるにもかかわらず、CMV の場合、動物匹数を制限して抗ウイルス効果を定量的にかつ簡便に測定する方法は確立されていない。免疫抑制条件や脳内接種といった方法では、果たして何をみているのかが明確ではなく、健常な動物で抗 CMV 効果を測定する方法として皮下接種後のウイルスの広がりを観察することが有効ではないかと思われる。動物における評価法の検討過程で、GPCMV の個体での増殖に必須な遺伝子領域を見出すことができた。この遺伝子領域がコードする蛋白群の解析は、新たな抗ウイルス薬の標的となる可能性がある。今後抗 CMV 化合物の実用化を視野に入れ動物レベルでの検討をより推進したい。

E. 結論

- 1) ランダム化合物ライブラリーから選定した阻害化合物 133G4 などの作用機序を明らかにした。
- 2) 感染動物モデルでの有効性を示すための実験過程において、モルモット CMV の細胞培養では不要であるが、動物個体では必須な 1.6kb 領域を見いだした。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fukui Y, Shindoh K, Yamamoto Y, Koyano S, Kosugi I, Yamaguchi T, Kurane I, Inoue N. Establishment of a cell-based assay for screening of compounds inhibiting very early events in cytomegalovirus replication cycle and characterization of a compound identified using the assay. *Antimicrob Agents Chemother.* 52: 2420-7, 2008.
- 2) Nozawa N, Yamamoto Y, Fukui Y, Katano H, Tsutsui Y, Sato Y, Yamada S, Inami Y, Nakamura K, Yokoi M, Kurane I, Inoue N. Identification of a 1.6 kb genome locus of guinea pig cytomegalovirus required for efficient viral growth in animals but not in cell culture. *Virology* 379:45-54, 2008.

2. 学会発表

- 1) 福井良子、神道慶子、小杉伊三夫、山口十四文、倉根一郎、井上直樹「レポーター細胞株を用いた cell-based high-throughput screening により同定された新規抗サイトメガロウイルス (CMV) 化合物の作用機序の解析」第 18 回抗ウイルス療法研究会 5 月、鹿児島
- 2) 井上直樹、倉根一郎「水痘帯状疱疹ウイルス (VZV) およびサイトメガロウイルス (CMV) の前初期蛋白による転写活性化機能を阻害する新型抗ウイルス化合物の解析」第 56 回日本ウイルス学会学術集会 11 月、岡山
- 3) 山田壮一、野沢直樹、片野晴隆、倉根一郎、井上直樹「個体での増殖にのみ必須なモルモットサイトメガロウイルス (CMV) 1.6kb ゲノム領域の遺伝子群は、ヒト CMV の弱毒化に関与する遺伝子群に相同性を有する」第 56 回日本ウイルス学会学術集会 11 月、岡山

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

表1 用いたプライマー及びプローブ

	target	forward primer (5'→3')	reverse primer (5'→3')	probe (5'FAM→3'MGB/BHQ)
DNA	HCMV UL83	CGCAACCTGGTGCCCATGG	CGTTTGGGTTGCGCAGCGGG	TTCCGCGAAGATGC
	VZV IE62 237T	CCTCCGATACGGGACTTCAA	TGACCCGTCCTCGATACGTA	TTGGCGAAGAGCTAAC
	ヒトアルブミン	GCTGTCACTCTTGTGGGCTGT	AAACTCATGGGAGCTGTGGTT	CCTGTCACTGCCACACAAATCTCTCC
RNA	HCMV IE1*	CAAGTGACCGAGGATTGCAA	CACCATGTCCACTCGAACCTT	TCCTGGCAGAAGTCTGCAAAACAGA
	HCMV IE2*	TGACCGAGGATTGCAACGA	CGGCATGATTGACAGCCTG	TGGCAGAAGTCTGGTGCATCTCTCGC
	HCMV UL112/113*	TGACCGACGTTGGCCG	CAATCATTGAGCATTTTGGTCAA	CCGACGGAATCCGCGGCGCCTCAG
	HCMV UL89*	GCGCCTTTTTGCCAGTTG	ACCAGCAGCAAGTGAAGTTTT	TACAACCAACAGCATCCGAGGAC
	VZV ORF21	TGTTGGCATTGCCGTTGA	ATAGAAGGACGGTCAAGAACCA	CTGCTTCCCCAGCAGTCCCGTC
	VZV ORF29	GCGGAACTTTCGTAACCAA	CCCCATTAACAGGTCAACAAAA	TCCAACCTGTTTTGCGGCGGC
	VZV IE62	CCTTGGAAACCATGATCGT	AGCAGAAGCCTCTCGACAA	TGCAACCCGGGCGTCCG
	ヒトG6PD*	TCTACCGCATCGACCACTACC	GCGATGTTGTCGGGTTTC	ATGGTGTGAGATTGGCAACAGGA

* splicing junctionを標的とする

表2 133G4 など化合物の構造と効果濃度



化合物名	骨格	側差R	50%効果濃度 (μM)		50%細胞増殖 阻害濃度(μM)
			HEL細胞	レポーター細胞	
133G4	$\text{NO}_2\text{-X-R}$	—Cl	4.5 ± 1.0	8.9 ± 1.8	>160
179H7	$\text{NO}_2\text{-X-R}$		33.8 ± 6.3	4.7 ± 1.4	>160
133G4#1	X-R	—Cl	>32	>40	>160
15E8	$\text{NO}_2\text{-X}'\text{-R}$		8.4 ± 3.2	15.2 ± 3.6	22.7 ± 3.1
GCV			1.4 ± 0.2	NA	>100

図1 IE2 依存プロモーターに対する133G4 の効果

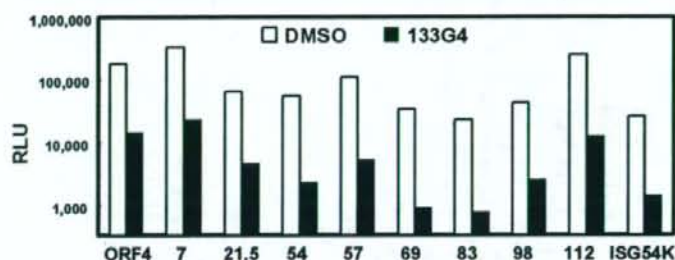
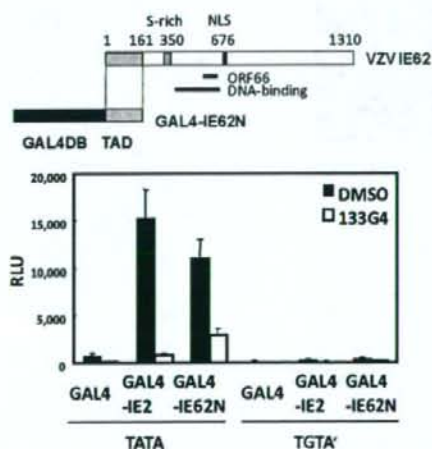


図2 GAL4 融合蛋白を用いた遺伝子活性化阻害機序の解析

A



B

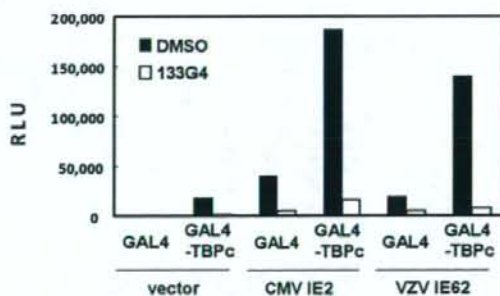


図3 ChIP アッセイによるプロモーターへのポリメラーゼ II 結合量の解析

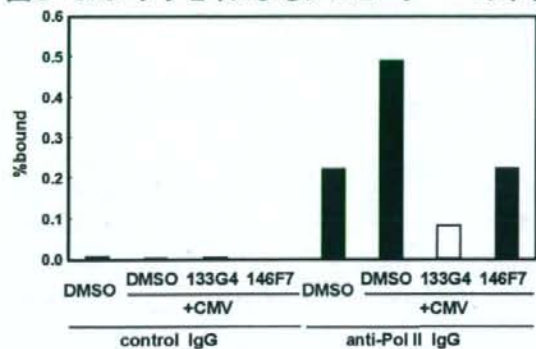


図4 スクリーニングで同定された VZV 活性を有する化合物の評価

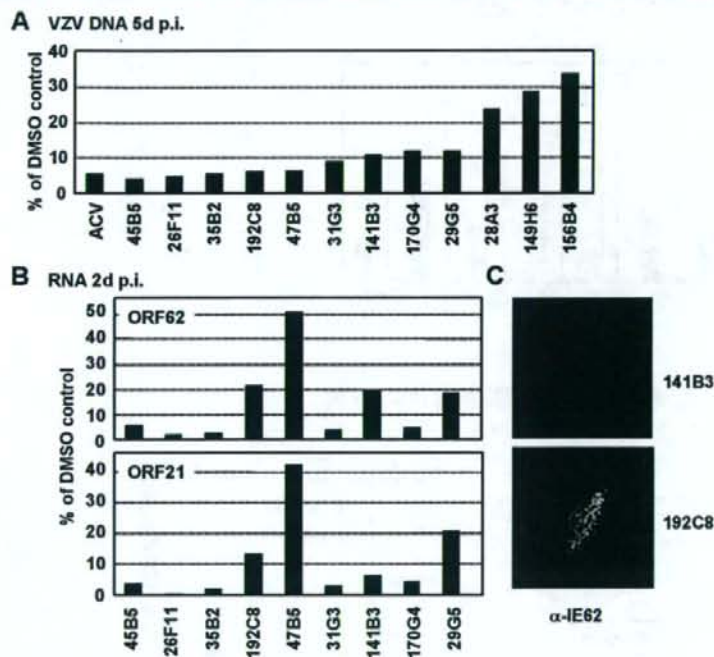


図5 抗 CMV 化合物評価のための方法の検討

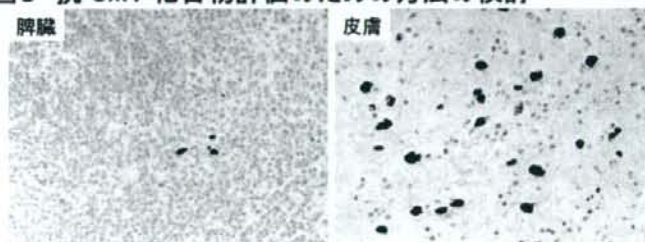
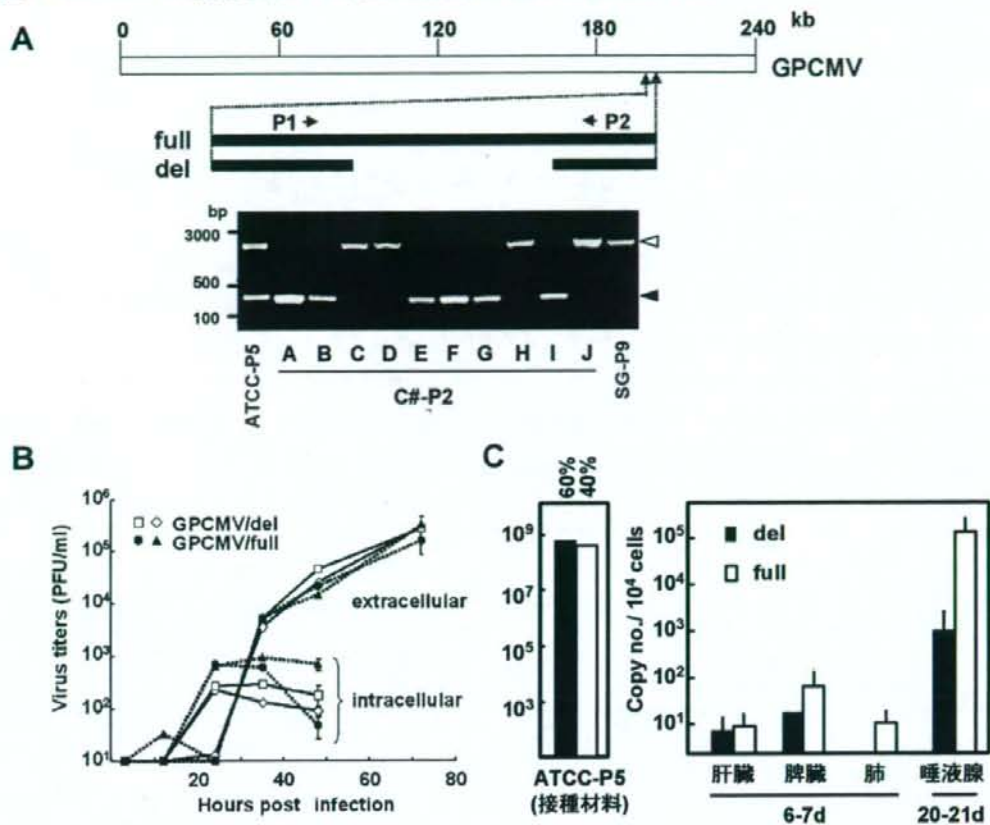


図6 GPCMV の動物個体での増殖に必要な遺伝子領域の同定



研究要旨：造血幹細胞移植後の HHV-6 再活性化機序を明らかにするとともに、移植後ヘルペスウイルス感染症の中で重要性の高い CMV、EBV 感染との関連性も明らかにするため、経時的に採取した患者末梢血をウイルス学的に解析すると共に、各ウイルス感染状況と種々のバックグラウンドとの関連性について解析した。造血幹細胞移植患者での HHV-6 の再活性化は移植後 2 週間から 4 週間にかけて約半数の患者で認められた。CMV や EBV の再活性化とは異なる感染パターンであり、再活性化にかかわる宿主側因子も異なっている可能性が示唆された。患者背景との関連性を解析した結果、性別には関連はなく、原疾患（悪性腫瘍 vs 非悪性腫瘍）は EBV と HHV-6 感染に関連性があった。ドナーソースは HHV-6 感染と関連が認められ、HLA マッチングについては EBV 感染との関連性が確認された。

A. 研究目的

昨年度までの研究で、造血幹細胞移植や肝移植患者における移植後 HHV-6 再活性化に TNF- α や IL-6 といった炎症性サイトカインが重要な役割を果たしていることが示唆された。一方で、このような患者においては拒絶反応、GVHD、他の感染症など様々なファクターがサイトカイン合成に関与すると考えられ、HHV-6 再活性化のメカニズム解明においても総合的な解析が必要と思われる。昨年度の研究で、移植後ヘルペスウイルス感染症として重要な 3 つのウイルス、CMV、EBV、HHV-6 の再活性化とサイトカインの関連性を解析したが、あまり明確な結果を得ることができなかった。原疾患、移植前処置、ドナーソース、GVHD 合併の有無などの宿主要因に加え、各ウイルス感染相互の影響も大きいと考えられる。そこで、今年度の研究ではこれら 3 種類のウイルスについて、各ウイルス再活性化にかかわる因子を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

対象は名古屋大学小児科、名古屋第一赤十字病院小児科にて造血幹細胞移植を受けた小児 51 名（男児：28 例、女児：23 例、平均年齢：8 \pm 5.4 歳）。患児の背景（原疾患、ドナーグラフト種類、HLA タイピング）についてはカルテを基に後方視的に調べた。全血 200 μ l から DNA を抽出し、リアルタイム PCR 法にて EBV、CMV、HHV-6 DNA 量を測定。HHV-6 についてはウイルス分離、抗体測定も行った。EBV は 1000 コピー/ μ g DNA、CMV は 100 コピー/ μ g DNA、HHV-6 は 10 コピー/ μ g DNA を感染ありと規定しウイルス再活性化状況を解析。

評価項目は、①移植後ウイルス DNA 量の推移、感染頻度の比較、②性別、③原疾患（悪性腫瘍 vs 非悪性腫瘍）、④移植種類（臍帯血移植 vs 血縁者間骨髄移植 vs 非血縁者間骨髄移植）、⑤HLA マッチング（HLA マッチ vs HLA ミスマッチ）。統計学的解析は Mann-Whitney U 検定、あるいは Kruskal-Wallis 検定を用いて行い、累積感染率比較は Logrank 検定で行った。

尚、保護者あるいは患者に対するインフォームドコンセントの後、これらの検体採取を実施した。

C. 研究結果

ウイルス DNA 量を基準として各ウイルス再活性化状況を解析した結果、HHV-6 についてはこれまで同様移植後 2 週から 3 週に再活性化のピークを認めたが（ウイルス DNA 量とウイルス感染頻度共に）、EBV、CMV については明らかなピークは認められなかった。3 種類のウイルスとも、移植後約 2 ヶ月間にほぼ半数の患児で再活性化が認められた（Figure 1）。性別により各ウイルスの再活性化頻度に差はなかった。原疾患と再活性化の頻度について解析した結果、EBV は非悪性腫瘍群で有意に再活性化の頻度が高く（Figure 2）、HHV-6 については悪性腫瘍群で有意に高頻度だった（Figure 3）。ドナーソースとの種類については、HHV-6 感染のみが臍帯血移植群、非血縁群、血縁群の順に高頻度であったが（Figure 4）、他の 2 種類のウイルスではそのような傾向は認められなかった。HLA タイピングについての解析では、EBV 感染がミスマッチ群で有意に高頻度（Figure 5）、CMV と HHV-6 については有意な相関はなかった。

これらの成績を総合すると、①性別は 3 種類の

ウイルス再活性化には関連なし。②基礎疾患はEBV再活性化とHHV-6再活性化に関連があり、EBV再活性化は非悪性腫瘍群で再活性化頻度が高かったのに対し、HHV-6は悪性腫瘍群で再活性化の頻度が高く、この二つのウイルスで全く逆の結果となった。③ドナーソースについては、HHV-6再活性化のみに関連性があり、臍帯血移植患者で有意に高値を示した。④HLAマッチングはEBV再活性化にのみ関連性があり、ミスマッチ患者で有意に高値を示した。

Figure 1. 造血幹細胞移植後の累積感染率の推移 (緑: EBV、青: CMV、赤: HHV-6) (%)

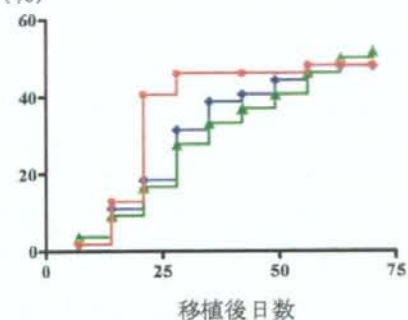


Figure 2. 原疾患によるEBV累積感染率の比較 (青: 悪性腫瘍群、赤: 非悪性腫瘍群) (%)

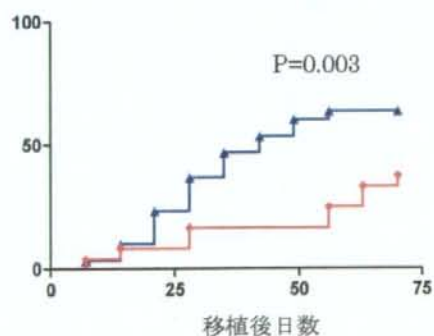


Figure 3. 原疾患によるHHV-6感染率の比較 (青: 悪性腫瘍群、赤: 非悪性腫瘍群) (%)

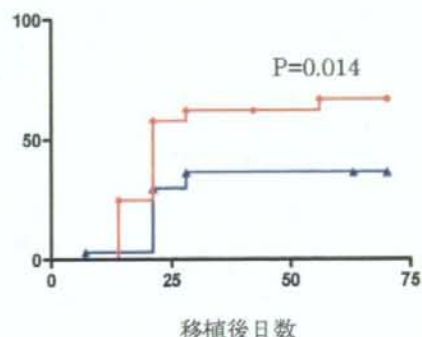


Figure 4. ドナーソースによるHHV-6感染の比較 (緑: 臍帯血移植、赤: 非血縁、青: 血縁) (%)

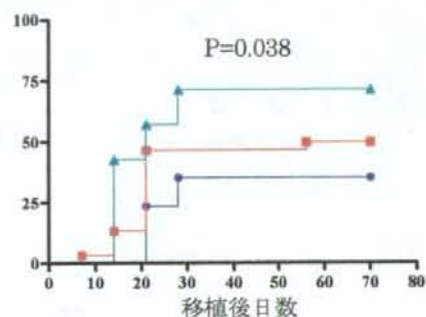
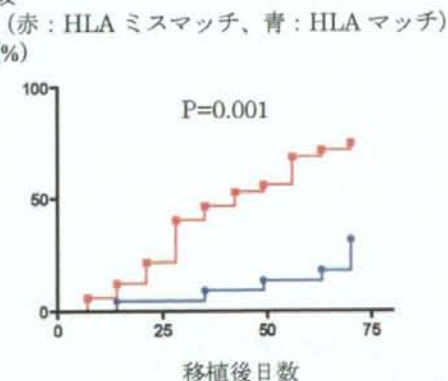


Figure 5. HLAマッチングによるEBV感染率の比較 (赤: HLAミスマッチ、青: HLAマッチ) (%)



D. 考察

以上のような結果から、同じヘルペスウイルスでもそれぞれのウイルスで再活性化にかかわる因子が異なることが示唆された。臍帯血移植は、ドナーグラフトが免疫学的にナイーブなため感染の頻度が増すと考えられていたが、今回の解析ではEBV、CMV感染のリスク因子とはならなかった。各ウイルス間で、感染制御にかかわる宿主免疫機構が微妙に異なる可能性が考えられる。

今回の解析は単変量解析であり、今後有意な関連性が認められた因子間の相互関係を考慮し多変量解析を進める必要がある。EBV感染がHLAミスマッチ群で有意に高値を示したが、これには前処置方法の相違が影響している可能性が考えられる。そのためには今後さらなる症例の蓄積を進めるとともに、今回解析した因子以外にATG使用歴(T細胞機能抑制)や放射線照射歴などの他の因子についても解析を進めてゆきたい。

E. 結論

造血幹細胞移植患者でのHHV-6の再活性化は移植後2週間から4週間にかけて約半数の患者で認められた。CMVやEBVの再活性化とは異なる感染パターンであり、再活性化にかかわる宿主側因子も異なっている可能性が示唆された。患者背景との関連性を解析した結果、性別には関連はなく、原疾患(悪性腫瘍 vs 非悪性腫瘍)はEBVとHHV-6感染と関連性があった。ドナーソースはHHV-6感染と関連が認められ、HLAマッチングについてはEBV感染との関連性が確認された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Human herpesvirus 6 infection in adult living related liver transplant recipients. Ohashi M, Sugata K, Ihira M, Asano Y, Egawa H, Takada Y, Uemoto S, Yoshikawa T. Liver Transplant 2008 14:100-9.

2. Elevated serum cytokine levels are associated with human herpesvirus 6 reactivation in hematopoietic stem cell transplantation recipients. Fujita A, Ihira M, Suzuki R, Enomoto Y, Sugiyama H, Suga S, Asano Y, Yagasaki H, Kojima S, Matsumoto K, Kato K, Yoshikawa T. J Infect. 2008 57:241-8.

2. 学会発表

45th Annual Meeting of the IDSA, San Diego, CAにて発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当せず